FR

Anti-Borrelia rec. IgM ELISA

Test immunoenzymatique pour la détection *in vitro* des anticorps IgM dirigés contre l'antigène de *Borrelia burgdorferi* dans le sérum ou le plasma.

Conditionnement

REF [6] 807 023 96 tests IVD coffret de tests complets

Irritant

Usage prévu

Le test Anti-Borrelia rec. IgM ELISA de Biotest est un test de diagnostic *in vitro* IVD pour la détection des anticorps IgM dirigés contre les antigènes de *Borrelia burgdorferi*, agent pathogène de la maladie connue sous le nom de borréliose de Lyme [1]. Dans 30 à 60% de cas, il se forme un anneau rouge qui s'étend excentriquement à partir du site de pénétration (érythème migrant, EM). Une à trois semaines après l'apparition de l'érythème, on peut détecter des anticorps IgM. Il a été démontré que la moitié environ des patients ayant un EM développent exclusivement des anticorps IgM. Dans le cas de patients développant aussi des anticorps IgG, l'augmentation du titre d'IgG peut dans certaines circonstances ne pas être mesurable avant 5 à 6 semaines après l'infection [2]. Cependant, pour la détection d'anticorps, le fait que le titre en anticorps dépende de la durée d'infection et du stade clinique doit être pris en compte. En outre, des cas séronégatifs présentant des symptômes cliniques distincts ont également été décrits. Enfin, l'interprétation des données du laboratoire peut être compliquée en outre par des anticorps IgM persistants, par des réactions croisées et par des cicatrices sérologiques. Un diagnostic par étape, dans lequel la détection de l'infection est réalisée en utilisant un ELISA au stade 1, et les résultats positifs sont confirmés au stade 2 par un immunotransfert [3], est accepté généralement. On peut utiliser le test Anti-Borrelia IgM ELISA comme test de stade 1 pour le diagnostic de *Borrelia*.

Principe de la méthode

Le test Anti-Borrelia IgM ELISA est un test immunoenzymatique, avec antigène adsorbé (ELISA), très sensible, pour la détection d'anticorps spécifiques de *Borrelia* dans le sérum ou le plasma. Pendant la première étape d'incubation, les anticorps IgM de l'échantillon vont se lier aux antigènes recombinants (rec.) OspC et à la protéine de fusion de la flagelline interne p41PKo-p41PBi (4) tapissant la MTP. La matière non spécifique sera éliminée par lavage. Le complexe anticorps-antigène obtenu est détecté en utilisant un anticorps monoclonal spécifique, marqué par une enzyme (peroxydase), dirigé contre l'IgM humaine. Le conjugué lié de façon non spécifique est éliminé par une autre étape de lavage. Pendant la dernière incubation, la solution de substrat (TMB, 3,3´5,5´-tétraméthylbenzidine) est introduite dans les puits. La réaction enzymatique est arrêtée par addition d'acide sulfurique (la couleur passe du bleu au jaune) et la densité optique est mesurée avec un spectrophotomètre à 450 nm et avec une longueur d'onde de référence de 615-690 nm.

La trousse contient

MTP	1	**Microplaque** 12 barrettes sécables de 8 puits chacune, tapissés par OspC rec. et la protéine de fusion de la flagelline p41Pko-p41Pbi (concentration: > 0,5 µg/ml).
NC	1,2 ml	**Contrôle Borrelia IgM-négatif** (prêt à l'emploi, humain) conservateur: 0,005 % de gentamicine, 0,05 % de streptomycine, 0,05 % de pénicilline V.
PC	1,2 ml	**Contrôle Borrelia IgM-positif** (prêt à l'emploi, humain) conservateur: 0,005 % de gentamicine, 0,05 % de streptomycine, 0,05 % de pénicilline V.
STD	1,2 ml	**Etalon Borrelia IgM** (prêt à l'emploi, humain) conservateur: 0,005 % de gentamicine, 0,05 % de streptomycine, 0,05 % de pénicilline V.
DIL	45 ml	**Diluant de l'échantillon** (prêt à l'emploi) conservateur: 0,01 % de sulfate de néomycine, 0,03 % de chloramphénicol
CONJ	15 ml	**Conjugué d'anti-IgM humain,** (prêt à l'emploi) anticorps monoclonal, marqué par de la peroxydase Conservateur: 0,025% de pénicilline V, 0,025% de sulfate de streptomycine, 0.2% de Proclin-300.
WB	6 ml	**Tampon de lavage concentré** (500 x) conservateur: 0,01 % de 2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol
SUB	13 ml	**Solution de substrat** (prête à l'emploi) Solution de 3,3´,5,5´-tétraméthylbenzidine (TMB) < 0,05 % dans H_2O. Voir avertissement et précautions.
STOP	15 ml	**Solution d'arrêt** (prête à l'emploi) Acide sulfurique < 1 N H_2SO_4
SB	1	**Sachet de conservation:** sachet en polyéthylène pour conserver les barrettes de microplaques inutilisées.
FOL	3	**Feuilles transparentes auto-adhésives:** Feuilles transparentes auto-adhésives pour recouvrir les puits des microplaques pendant l'incubation.
	1	**Notice du coffret**

Conservateurs: concentration totale < 0,1%

Matériaux nécessaires, mais non fournis avec la trousse

micropipettes, photomètre spectral (450 nm, longueur d'onde de référence 615 – 690 nm), laveur de microplaques (avec lavage de fond) et incubateur à 37°C pour les MTP.

Avertissement et précautions

Conjugué est irritant (Proclin-300). Ne pas incorporer de réactifs. Eviter le contact avec les yeux et la peau. Traiter tous les échantillons et les matières utilisées pour le test comme des produits potentiellement infectieux et prendre les mesures de sécurité appropriées. Les contrôles sont négatifs pour anti-HIV 1/2, anti-HCV, HB_SAg, anti-syphilis et les transaminases élevées. Ne pas pipeter à la bouche. Conformément aux bonnes pratiques de laboratoire, porter des gants, une blouse de laboratoire et des lunettes de sécurité. Décontaminer les matières liquides et non-combustibles avec de l'hypochlorite de sodium (concentration finale: 3 %, temps d'action, au moins 30 minutes). Neutraliser obligatoirement les déchets liquides contenant des acides avant leur élimination. Autoclaver obligatoirement les MTP utilisées et les matières à réemployer pendant 1 heure à 121°C. La SUB est sensible à la lumière et doit être mise à l'abri de celle-ci. Le test doit être exécuté par des techniciens de laboratoire bien formés et agréés. Exécuter le test dans des conditions aseptiques et microbiologiquement contrôlées. En cas de trousse d'origine détériorée, en informer le fabricant.

Stockage

Les réactifs, s'ils sont stockés à 2-8°C, sont stables jusqu'aux dates de péremption figurant sur chaque étiquette individuelle. Après ouverture des réactifs, ceux-ci doivent être utilisés dans les 30 jours. En cas de répétition de tests, conserver les réactifs, immédiatement après usage, à 2-8°C. Enfermer la MTP dans un sachet d'aluminium avec un déshydratant et la mettre à la température ambiante avant ouverture. Remettre les barrettes inutilisées avec le déshydratant dans le sachet refermable et les conserver ainsi à 2-8°C. Ne pas toucher avec les doigts le bord supérieur ni le fond des puits.

Préparation des réactifs

Diluer le tampon de lavage avec de l'eau déminéralisée ou désionisée (1:501). Le tampon ainsi préparé est stable pendant une semaine, conservé à 2-8°C. En cas de cristallisation après stockage entre 2 et 8°C, remettre le tampon de lavage concentré en solution en le portant à 37°C. Tous les autres composants du test sont prêts à l'emploi. Tous les réactifs sont spécifiques d'un lot ; ne pas les utiliser avec des trousses d'autres lots. Ne pas utiliser de réactifs d'autres fabricants.

Préparation des échantillons

Utiliser des échantillons de sérum ou plasma frais, sans hémolyse. Des échantillons de sérum ou de plasma à forte lipémie, ictériques ou à contamination microbienne et des préparations d'immunoglobuline concentrées risquent de donner des résultats de test non fiables. Eviter de congeler et décongeler les échantillons à plusieurs reprises. Si les échantillons doivent être transportés, les emballer conformément aux exigences réglementaires pour le transport de matières infectieuses. Ne pas inactiver les échantillons, car il pourrait se produire des réactions non-spécifiques.

Performance du test

Suivre strictement le protocole (voir la procédure de pipetage).

Dilution des échantillons au 1:21 avec prédilution dans des tubes

Diluer les contrôles PC, NC, STD et les échantillons au 1:21 dans un tube (par exemple, 25 µl de contrôle ou d'échantillon + 500 µl de DIL). Bien mélanger.

Dilution des échantillons au 1:21 avec dilution directement dans la plaque

Pipeter 200 µl de DIL dans chaque puits. Cette dilution directement dans la microplaque convient tout particulièrement bien en cas d'utilisation de dispositifs de pipetage automatiques. Si la dilution est effectuée directement dans la plaque manuellement, il est important d'éviter la fixation non-spécifique de protéines en observant les étapes suivantes: Pipeter premièrement 200 µl de DIL dans le puits, puis ajouter 10 µl d'échantillon ou de témoins. Mélanger de 5 à 7 fois quand on ajoute les 10 µl d'échantillon ou de témoins.

Procédure de lavage

La procédure de lavage constitue un point critique. Un lavage insuffisant entraînerait une mauvaise précision et des réactions non-spécifiques.

L1: lavage manuel: laver 5 fois avec la solution tampon (aspirer le contenu du puits et ajouter 250 µl de solution tampon). Répéter cette étape 5 fois.

L2: lavage automatique: laver 3 fois avec 250 µl de solution tampon en utilisant le programme de lavage automatique.

Tapoter brièvement sur la plaque après lavage. Ne pas laisser la plaque sécher.

Procédure de pipetage pour la détermination qualitative d'IgM (dilution en tube

Laisser tous les réactifs atteindre la température ambiante avant emploi.				
Pipeter les contrôles et le blanc en dernier. Après pipetage des contrôles et des échantillons, mettre la plaque à incuber immédiatement.				
étape 1	**puits [µl]**			
	A1/B1	C1/ D1	E1/ F1	G1...
Blanc	200 DIL			
NC double test	--	200 NC	--	--
PC double test	--	--	200 PC	--
Echantillon 1:21	--	--	--	200
Recouvrir la MTP en utilisant des feuilles auto-adhésives (inutile dans un processeur ELISA*)				
Incubation **60 ± 2 mn**, 37 ± 1°C	processeur*: **60 ± 2 mn**, 37 ± 1°C			
Laver 5x (voir. W1)				
WB	550	550	550	550
étape 2	**puits [µl]**			
CONJ	100	100	100	100
Recouvrir la MTP en utilisant des feuilles auto-adhésives (inutile dans un processeur ELISA*)				
Incubation **30 ± 1 mn**, 37 ± 1°C	processeur*: **30 ± 1 mn**, 37± 1°C			
Laver 5x (voir. W1)				
WB	550	550	550	550
étape 3	**puits [µl]**			
SUB	100	100	100	100

CE

BIO-RAD

Incubation **30 ± 1 mn**, à la température ambiante dans l'obscurité	processeur*: **20 ± 1 mn,** à la température ambiante dans l'obscurité			
STOP	100	100	100	100
Mesurer l'extinction immédiatement ou dans les 15 mn suivant l'arrêt, à 450 nm, en utilisant un spectrophotomètre spectral (longueur d'onde de référence: 615 - 690 nm).				

Procédure de pipetage pour la détermination quantitative d'IgM (dilution en tube

Laisser tous les réactifs atteindre la température ambiante avant emploi.				
Pipeter les contrôles et le blanc en dernier. Après pipetage des contrôles et des échantillons, mettre la plaque à incuber immédiatement.				
étape 1	**puits [µl]**			
	A1/B1	C1/ D1	E1/ F1	G1...
Blanc	200 DIL			
NC double test	--	200 NC	--	--
PC / STD double test	--	--	200 PC / STD	--
Echantillon 1:21	--	--	--	200
Recouvrir la MTP en utilisant des feuilles auto-adhésives (inutile dans un processeur ELISA*)				
Incubation **60 ± 2 mn**, 37 ± 1°C	processeur*: **60 ± 2 mn**, 37 ± 1°C			
Laver 5x (voir. W1)				
WB	550	550	550	550
étape 2	**puits [µl]**			
CONJ	100	100	100	100
Recouvrir la MTP en utilisant des feuilles auto-adhésives (inutile dans un processeur ELISA*)				
Incubation 30 ± 1 mn, 37 ± 1°C	processeur*: **30 ± 1 mn**, 37± 1°C			
Laver 5x (voir. W1)				
WB	550	550	550	550
étape 3	**puits [µl]**			
SUB	100	100	100	100
Incubation **30 ± 1 mn**, à la température ambiante dans l'obscurité	processeur*: **20 ± 1 mn,** à la température ambiante dans l'obscurité			
STOP	100	100	100	100
Mesurer l'extinction immédiatement ou dans les 15 mn suivant l'arrêt, à 450 nm, en utilisant un spectrophotomètre spectral (longueur d'onde de référence: 615 - 690 nm).				

* En cas d'utilisation de processeurs ELISA, l'opérateur doit valider le test sous sa propre responsabilité.

Calcul de la détermination qualitative
Après mesure des valeurs d'extinction à 450 nm dans tous les puits (filtre de référence: 615 - 690 nm), soustraire la valeur moyenne des blancs des valeurs d'extinction des contrôles et des échantillons. Extinction moyenne des blancs ≦ 0,060. Après soustraction du blanc, les valeurs des contrôles doivent satisfaire les critères de validité suivants:

DO moyenne de NC: ≦ 0,100 DO moyenne de PC: ≧ 0,400

Calcul de la détermination quantitative
Le kit comprend une solution standard conforme aux directives RiliBÄK de l'ordre fédéral de médicins allemands (7) pour la détermination quantitative.
Après mesure des valeurs d'extinction à 450 nm dans tous les puits (filtre de référence: 615 - 690 nm), soustraire la valeur moyenne des blancs des valeurs d'extinction des contrôles et des échantillons. Extinction moyenne des blancs ≦ 0,100. Après soustraction du blanc, les valeurs des contrôles doivent satisfaire les critères de validité suivants:
DO moyenne de NC: ≦ 0,200, DO moyenne de STD: ≧0,800

Calcul de la valeur seuil et de la zone grise
La valeur seuil est calculée à partir de la DO moyenne des contrôles négatifs (NC $\overline{X}$) à laquelle on ajoute 0,300. Valeur seuil = NC $\overline{X}$ + 0,300. La zone grise s'étend entre la valeur seuil et la valeur seuil moins 10%.

Interprétation du résultat
Les échantillons ayant une valeur d'extinction inférieure à la zone grise sont considérés comme négatifs. Si un échantillon a une valeur d'extinction égale ou supérieure à la zone grise, il est considéré comme positif pour les anticorps IgM spécifiques de *Borrelia*. Si la valeur de DO de l'échantillon retesté est dans la zone grise (résultat douteux), nous recommandons de demander un nouveau prélèvement.

Limites de la méthode
Un résultat négatif dans le test Anti-Borrelia IgM ELISA n'exclut pas avec une certitude absolue la possibilité d'une infection par *Borrelia*. Les résultats du test doivent toujours être considérés en association avec les données cliniques du patient et les autres méthodes de diagnostic.

Performance
Au total, 45 échantillons cliniques provenant de patients atteints d'érythème migrant ont été étudiés. Parmi ces sérums, 36 échantillons (80%) étaient positifs dans le test Anti-Borrelia IgM et/ou IgG ELISA . Au total, 92 échantillons cliniques provenant de patients atteints d'arthrite de Lyme ont été étudiés. Tous les sérums (100%) étaient positifs dans le test Anti-Borrelia IgM et/ou IgG ELISA . Dans une étude portant sur 22 échantillons de patients atteints de neuroborréliose, en majorité des enfants, 14 sérums (68%) étaient positifs dans le test Anti-Borrelia IgM et/ou IgG ELISA . Dans une autre étude, au total 1007 sérums provenant de donneurs de sang sains de la région du Rhin et du Main n'ayant pas été mordus par une tique et ne manifestant pas de signe de maladie de Lyme ont été testés par le test Anti-Borrelia IgM et/ou IgG ELISA . Parmi eux, 90 sérums (9%) ont présenté une réactivité pour IgG et 94 sérums (9%) une réactivité pour IgM.
La spécificité des tests Anti-Borrelia IgM et IgG ELISA est de 91 %.

Réactivité croisée
Les tests Anti-Borrelia IgM et IgG ELISA ont été évalués en utilisant les 75 échantillons suivants, potentiellement susceptibles de donner des réactions croisées: 10 infections par l'EBV, 50 sérums positifs pour la syphilis, 15 sérums positifs pour le facteur rhumatoïde. Sur les 10 sérums EBV-IgM, quatre ont réagi dans le test Anti-Borrelia IgM ELISA. Trois de ces sérums présentaient au moins une bande p41 dans le transfert de western. Sur les 50 sérums positifs pour la syphilis, trois ont réagi dans le test Anti-Borrelia IgG ELISA et ceux-ci ont présenté au moins une bande dans le transfert de western. Cinq sérums ont réagi dans le test Anti-Borrelia IgM ELISA, et, parmi eux, quatre ont présenté au moins une bande dans le transfert de western. Comme il est possible qu'il se produise une stimulation polyclonale des lymphocytes B dans les infections par EBV, (mononucléose infectieuse), une réaction non-spécifique ne peut pas être exclue, en particulier pour la détermination d'anticorps IgM. Il est par conséquent recommandé d'exclure d'abord la possibilité d'une infection par l'EBV dans le cas d'une réponse IgM faible et d'une anamnèse peu claire. Il a été possible de démontrer que, en utilisant les antigènes de *Borrelia* recombinants, on peut exclure dans une très large mesure une réaction croisée avec *Treponema pallidum, Borrelia recurrentis, Borrelia duttonii, Borrelia hermsii* et *Leptospira sp.* [5]. Cependant, dans le cas d'une infection syphilitique active, ou de la présence de cicatrices sérologiques de syphilis, de faux résultats positifs peuvent apparaître dans quelques cas individuels. Pour cette raison, il faut éliminer la possibilité d'une infection syphilitique. La présence de facteurs rhumatoïdes peut conduire à une interférence dans le test IgM, cependant cette interférence peut être résolue dans un transfert de western de confirmation grâce au profil différencié des bandes. Si nécessaire, on peut réaliser une pré-absorption en utilisant la procédure de l'absorption des facteurs rhumatoïdes (par exemple N° de cat. Bio-Rad 807799) conformément aux instructions. Sur 15 sérums avec RF, cinq ont réagi dans le test Anti-Borrelia IgM ELISA. Ces sérums ont présenté au moins une bande p41 dans le transfert de western. En outre, 30 échantillons anti-HSV et 30 anti-toxoplasmose positifs ont été analysés. Pour les tests IgM et IgG ELISA, une spécificité de 97% a été déterminée. Aucune réaction faussement positive n'a été observée avec les tests IgM et IgG de Borrelia ELISA dans l'analyse de 30 échantillons anti-syphilis-positifs.

Etude de la précision
Un échantillon négatif, un échantillon faiblement réactif et un échantillon très réactif ont été testés trois jours différents dans 6 puits. La variabilité moyenne inter-séries de ces sérums a été, respectivement, de 8,9%, 6,6% et 6,7%.
Un échantillon négatif, un échantillon faiblement réactif et un échantillon très réactif ont été testés six fois dans une même série. La variabilité moyenne intra-séries de ces sérums a été, respectivement, de 15,4%, 6,4% et 6,7%.

Littérature

1. Stanek, G. et coll. (1996). European Union concerted action on risk assessment in Lyme borreliosis: clinical case definitions for Lyme borreliosis. *Wien. Klin. Wochenschr*. 108/23, 741-747.
2. Craft, J. et coll. (1984). Antibody response in Lyme disease; evaluation of diagnostic tests. *J. Infect. Dis*. 149, 789,795.
3. Empfehlungen zur Diagnostik und Therapie der Lyme-Borreliose. *Epidemiologisches Bulletin* 22, 159-161, 1998.
4. Hunfeld, K.-P. et coll. (2002). Development and laboratory evaluation of a new recombinant ELISA for the serodiagnosis of Lyme disease. *Wien Klin. Wochenzeitschrift* 114/13-14, 580-585.
5. Bruckbauer, H.R., et coll. (1992). Cross-reactive Proteins of Borrelia burgdorferi. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*. 11, 224 – 232**.**
6. DIN EN ISO 980 Graphic symbols for use in the labelling of medical devices .
7. Bundesärztekammer: Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung labormedizinischer Untersuchungen, 2008

Guide de dépannage
1) Taux élevé, et inattendu, de résultats réactifs. Des échantillons ou des contrôles ont été pipetés avant le pipetage de DIL ou bien le mélange a été insuffisant.
2) Valeur moyenne du blanc supérieure au critère de validité, DO > 0,060:
   a) SUB devenue bleue par oxydation ou contamination.
   b) Erreur de lavage: Effectuer l'étape des 5 cycles de lavage. Si l'on utilise un dispositif de lavage manuel, effectuer 7 cycles de lavage de l'étape de lavage. Utiliser le WB de Bio-Rad contenu dans la trousse.
   c) Erreur d'incubation: température trop haute, durée d'incubation dépassée ou plaque non incubée directement après la fin du pipetage.
   d) Erreur de longueur d'onde: une mesure sans filtre de référence augmentera les valeurs de DO d'approximativement + 0,120
3) Coloration jaune dans tous les puits: (voir 2a, 2b)
   a) WB contaminé ; préparer un nouveau tampon de lavage
   b) DIL ou CONJ contaminé ; répéter le test avec des réactifs provenant de flacons encore fermés. Utiliser les réactifs dans des conditions plus aseptiques.
4) Valeur de DO moyenne de PC, STD inférieure à <0,400:
   a) Date de péremption dépassée.
   b) Température trop basse ou durée d'incubation trop faible.
   c) Erreur de lavage: lavage trop intensif ou contact mécanique entre le distributeur et la phase solide du puits.
   d) Contamination de PC, STD ou 3b.
5) Valeur de DO moyenne de NC supérieure à > 0,100: (voir 1 et 2 a-d)
   a) NC n'a pas été pipeté après le pipetage des échantillons ; pipeter tous les échantillons avant de pipeter les blancs et les contrôles.
   b) Contamination par le couvercle du PC, STD.

Bio-Rad Medical Diagnostics GmbH
Industriestr. 1, D-63303 Dreieich, Germany
Tel.: +49-6103-801-95, Fax: +49-6103-801-724
www.bio-rad.com, techsupport.bmd@bio-rad.com

CE

187904/10 – 04/2011